



Espacenet

Bibliographic data: JP 55156592 (A)

PREPARATION OF ANTIBIOTIC SUBSTANCE* GENTAMICIN C1A

Publication date: 1980-12-05

Inventor(s): FUJII TADAYO; SATOI SHIYUZO; MUTOO NAOKI; KODAMA AKIRA; KOTANI MASARU ±

Applicant(s): TOYO JOZO KK ±

Classification: - international: A61K35/74; C12P1/06; C12R1/01; (IPC1-7): C12P1/06; C12R1/01
- European:

Application number: JP19790060021 19790515

Priority number(s): JP19790060021 19790515

Also published as: • JP 61022955 (B)
• JP 1355899 (C)

Abstract of JP 55156592 (A)

PURPOSE:To prepare an antibiotic substance, gentamicin C1a, by culturing gentamicin C1a-producing fungi belonging to Dactylosporangium genus. **CONSTITUTION:**Fungi capable of producing an antibiotic substance, gentamicin C1a, and belonging to Dactylosporangium genus, e.g. Dactylosporangium thailandense G367, etc. are cultured in a conventional culturing medium at 25-35 deg.C for 100-200hr under aeration, and after adjusting the pH of the cultured medium to acidic range, the medium is neutralized and filtered to obtain the filtrate of the cultivation products. The filtrate is treated with an anion exchange resin, the adsorbed active substance is eluted with 2N aq. ammonia, and the eluate is concentrated, adjusted on pH, and treated with an anion exchange resin.; The adsorbed material is eluted with aq. ammonia having concentration gradient extending over 0 and 0.35N, and the active fraction is concentrated under reduced pressure, and freeze-dried to obtain the objective antibiotic substance, gentamicin C1a.

Last updated: 04.04.2011 Worldwide Database 5.7.20, 92p

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭55—156592

⑬ Int. Cl.³
C 12 P 1/06
// C 12 R 1/01

識別記号

庁内整理番号
6760—4B

⑭ 公開 昭和55年(1980)12月5日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 7 頁)

⑮ 抗生物質ゲンタミシンC1aの製造法

静岡県田方郡大仁町三福685

⑯ 特 願 昭54—60021

⑯ 発 明 者 児玉章

⑰ 出 願 昭54(1979)5月15日

静岡県田方郡函南町平井1900の
3

⑱ 発 明 者 藤井忠代

⑱ 発 明 者 小谷勝

三島市光ヶ丘15の4

静岡県田方郡大仁町田京727の
3

⑲ 発 明 者 里井秀三

⑲ 出 願 人 東洋醸造株式会社

静岡県田方郡函南町柏谷1277の
28

静岡県田方郡大仁町三福632の
1

⑳ 発 明 者 武藤直紀

明 細 書

1. 発明の名称

抗生物質ゲンタミシンC1aの製造法

2. 特許請求の範囲

(1) グクテロスポランジウム属に属する抗生物質ゲンタミシンC1a生産菌を培地に培養し、その培養物より抗生物質ゲンタミシンC1aを採取することを特徴とする抗生物質ゲンタミシンC1aの製造法。

(2) グクテロスポランジウム属に属する抗生物質ゲンタミシンC1a生産菌が、グクテロスポランジウム・タイランゲンセ G 367である特許請求の範囲第1項記載の抗生物質ゲンタミシンC1aの製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、抗生物質ゲンタミシンC1a (Gentamicin C1a) の新規な製造法に関する。

従来より抗生物質ゲンタミシンC1a生産菌としては、ミクロモノスポラ・プルプレア (Micromonospora purpurea; 特公昭44—21394号、

米国特許第3091572号、Antimicrob. agents and chemother. 1963第1, 8, 14, 17および116)、ミクロモノスポラ・エチノスポラ (Micromonospora echinosporea) およびその2変種 (上記同一文献)、ミクロモノスポラ・サガミエンス (Micromonospora sagamiensis) およびその2変種 (特開昭49—42888号)、およびミクロモノスポラ・プルプレア・バリエスタ・エグレッツェンス (Micromonospora purpurea var. nigrescens; ハンガリー国特許第168778号、J. Antibiot. 30: 945 (1977)) が知られていた。上記の通り、抗生物質ゲンタミシンC1a生産菌は、すべてミクロモノスポラ属 (Micromonospora) に属するものであり、その形態的特徴は基生菌糸に個づつ胞子を形成するものであり、さらにミクロモノスポラ属はミクロモノスポラ科 (Micromonosporaceae) に属するものであった (Bergey's manual of determinative bacteriology 第8版 (1974))。

本発明者らは、静岡県富士市の細土旗より分離

した放線菌 G 3 6 7 株が抗生物質ゲンタミシン C_{1a} を産生することを見出し、後述する通り、放線菌 G 3 6 7 株がダクテロスポランジウム属 (Dactylosporangium) に属するもので、その形態的特徴は基性菌糸に胞子のうを産生し、胞子のう中に鞭毛を有する胞子を形成するもので、さらにこのダクテロスポランジウム属はアクチノプラネス科 (Actinoplanaceae) に属するもので、従来のミクロモノスポラ属とは分類学上、明らかに別の段階での相違が認められるもので、抗生物質ゲンタミシン C_{1a} の新規な生産菌であることを見出した。

また上記の放線菌 G 3 6 7 株の菌学的諸性状は次の通りである。

〔Ⅰ〕 形態的性状

リンゴ酸カルシウム寒天培地 [Bact. Rev. 21 : 1 (1957)] 上、30℃、3～7日間培養し、観察した所見は次の通りである。

基性菌糸は曲線状または屈曲状で、分枝をなし、伸長し、分断はせず、直径 0.5～0.8 μ であり、

— 3 —

気菌糸は形成しない。

基性菌糸に、大きさ 1.5～2.0 × 2.5 μ の球状または楕円状物体の産生が、寒天培地中に懸つた状態でみられる。

基性菌糸より短かい胞子のう柄を生じ、胞子のうは指形で、寒天培地表面上に、1個または房状に形成する。胞子のうの大きさは、1.0～1.5 × 4.0～6.5 μ で、中に 3～4 個の胞子がたてに一列に入っている。

胞子は水中で運動性があり、形は球形、楕円形または洋梨形を呈し、大きさは 1.0～1.5 × 1.5～2.5 μ であり、極性で房状の鞭毛を有している。

〔Ⅱ〕 ジアミノピメリン酸組成

全菌体分析によるジアミノピメリン酸は、メゾー型およびメゾー型より R m 値の低いもの (slow moving diaminopimelic acid) が検出された。

〔Ⅲ〕 各種培地における生育状態等

各種培地上で、30℃、14日間培養し、観察した所見は次表の通りであり、オート・ミーン寒天培地上で未発育の気菌糸がわずかに形成される

— 4 —

以外は、気菌糸の形成は認められず、また胞子のうはリンゴ酸カルシウム寒天培地上で良好、土機寒天培地 [J. gen. Microbiol. 50 : 295 (1968)] 上で、中程房であり、その他の培地上ではわずかに、またほとんど形成されなかつた。

なお、色の表示は、カラー・ハーモニー・マニュアル (Color Harmony Manual) 第4版 1958年 (Container Corporation of America) による色の分類に従つたものである。

各種培地上における生育状態等

培 地	生 育	基 生 菌 糸 の 色	可 溶 性 色 素
シュクロース・硝酸塩寒天培地 (ワックスマン培地No.1)※	中程度ないし不良	アプリコット[Apricot (41a)]ないしダスティー・オレンジ (Dusty Orange (41c))	な し
グルコース・アスパラギン寒天培地 (ワックスマン培地No.2)※	不 良	ブライト・メロン・イエロー[Brite Melon Yellow (31a)]ないしアプリコット(41a)。	"
グリセリン・アスパラギン寒天培地 (ISP培地5)※※	僅少ないし不良	無色ないしライト・メロン・イエロー[Light Melon Yellow(35a)]	"
スターチ・無機塩寒天培地 (ISP培地4)※※	中程度ないし良好	ルセット・オレンジ[Russet Orange(4nc)]ないし ダスティー・オレンジ(41c)	"
チロシン寒天培地 (ISP培地7)※※	僅少ないし不良	アプリコット[Apricot (4ga)]ないしペール・パステル A・オレンジ[pale Pastel Orange(41c)]	"
オート・ミール寒天培地 (ISP培地3)※※	中程度ないし良好	オレンジ・ルスト[Orange Rust (4pe)]ないし ルセットオレンジ[Russet Orange(4pc)]	"
イースト・コリス・炭素エキス寒天培地 (ISP培地2)※※	"	メイプル[Maple (41e)]ないしラグッジ・タン [Luggage Tan (4ne)]	メイプル (41e)ないしライト・ ブラウン[Light Brown(4ng)]
リンゴ酸カルシウム寒天培地	不 良	無 色	な し
栄養寒天培地 (ワックスマン培地No.14)※	僅 少	"	"

- 6 -

ベネット寒天培地 (ワックスマン培地No.30)※	中程度ないし良好	メイプル (41e)ないしラグッジ・タン (4ne)	メイプル (41e)ないしライト・ブラウン (4ng)
エマソン寒天培地 (ワックスマン培地No.28)※	中 程 度	パステル・オレンジ (41c)ないしメイプル(41e)	メイプル (41e)
ハイキー・トレスナー寒天培地 (ワックスマン培地No.32)※	中程度ないし良好	シナモン[Cinnamon (31e)]ないしメイプル (41e)	メイプル (41e)ないしライト・スパイス ・ブラウン[Light Spice Brown (41g)]
グルコース・イースト・エキス寒天 培地 (ワックスマン培地No.29)※	中 程 度	メロン・イエロー[Melon Yellow (3gu)]	な し
ペプトン・イースト・エキス寒天 培地 (ISP培地6)※※	僅 少	無 色	"
土壌寒天培地	僅少ないし不良	"	"
ジャガイモ片 (ワックスマン培地No.40)※	中 程 度	タイルレッド[Tile Red (5nc)]ないし銅 [Copper (51c)]	"
ジャガイモ片+炭酸カルシウム	"	"	"
ニンジン片	僅 少	無 色	"

※ Wuxman, S. A. The Actinomyces Vol. 2, 1961 P. 327-334 Williams & Wilkins co.
 ※※ Inter. J. Syst. Bact. 16:313~340 (1966)
 ※※※ Antimicrob. Agents and Chemother. 1965 P. 116~124

- 7 -

〔N〕 生理的性状

生理的諸性状は下記の通りである。

1) 炭素源の資化性

炭素源	P & G ※	L m ※※
D-アラビノース	±	+
L-アラビノース	+	+
D-フラクトース	+	+
D-ガラクトース	+	+
D-グルコース	+	+
グリセロール	—	—
L-イノシトール	—	—
D-マンノース	+	+
D-マニトール	+	+
α-ソルビトール	+	+
β-ラクトース	+	±
ズルシトール	—	—
D-トレハロース	+	+
D-セロビオース	+	+
メレシトース	+	+
ラフィノース	+	—

— 8 —

- 4) メラニン様色素の生成：陰性（チロシンおよびペプトン・イーストエキス・鉄寒天培地上）
- 5) スターチの加水分解：陽性
- 6) セルロースの分解：陰性
- 7) カゼインの分解：陽性
- 8) チロシンの分解：陰性
- 9) セラチンの消化：陽性
- 10) 硫化水素の生成：弱い陽性
- 11) 硝酸塩の還元：陽性
- 12) 生育 PH：PH 5.5 ~ 9.0

上記の通り、本菌 G 3 6 7 の特徴としては、基生菌糸に指形の胞子のうを着生し、胞子のう中に胞子がたてに一列にならび、胞子に扇状の鞭毛を有していることにある。

このように、胞子のうを形成し、その中に鞭毛を有する胞子を形成するものは、アクチノプラネス科 (Actinoplanaceae) に属するものであつて、胞子のうが指形で、その中にたてに一列に胞子が形成されるものは、ダクテロスポランジウム属に属する。

— 10 —

特開昭55-156592(4)

L-ラムノース	+	+
D-リボース	—	—
L-ソルボース	—	—
D-ソルビトール	—	—
シュクロース	+	+
D-キシロース	+	+
アドニトール	—	—
ザリシン	± ~ +	± ~ +
スターチ	+	+
マルトース	+	+
デキストリン	+	+
イヌリン	—	—

+: 陽性、±: 疑陽性、—: 陰性

※: プリドハム・ゴットリーブの無機培地

※※: Inter. J. Syst. Bact. 21: 240—2

47 (1971) によるルエドマンの有機培地

2) 生育温度範囲: 20 ~ 40 °C

3) 脱脂牛乳: ペプトン化および凝固とともに陽性

— 9 —

さらに、本菌 G 3 6 7 株は有機培地上で、基生菌糸が橙褐色ないし褐色を呈し、褐色の可溶性色素を生ずる特徴を有することより、ダクテロスポランジウム・タイランアンセ (*Dactylosporangium thailandense*) [Arch. Microbiol. 58: 42—52 (1967)] に属するものと同定した。

よつて、本菌 G 3 6 7 を、ダクテロスポランジウム・タイランアンセ G 3 6 7 と命名したもので、また本菌は工業技術院微生物工学技術研究所に「申請書受理番号第 4840 号」として申請されている。

本発明は上記の知見に基づいて完成されたもので、ダクテロスポランジウム属に属する抗生物質ゲンタミシン C1a 生産菌を培地に培養し、その培養物より抗生物質ゲンタミシン C1a を採取することを特徴とする抗生物質ゲンタミシン C1a の製造法である。

まず本発明を実施するに当り使用されるダクテロスポランジウム属に属する抗生物質ゲンタミシン C1a (以下単に、ゲンタミシン C1a という) の

— 11 —

生産菌としては、上記のダクテロスポランジウム・タイランデンセ G 3 6 7 株がその一例として挙げられるもので、また本発明の使用菌はこれに限定されるものでなく、ダクテロスポランジウム属に属するゲンタミシン C1a 生産菌であればよく、天然または変異株も使用し得る。

次いで、本発明のゲンタミシン C1a を製造するに当つて例示すれば、上記のダクテロスポランジウム属に属するゲンタミシン C1a 生産菌を通常の微生物の培養に使用する培地成分を含む培地にて好氣的に培養することによつて得られる。培地としては、固型培地または液体培地が用いられるが、特に大量生産のためには液体培地、特に水性培地が適当である。

培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては同化可能な炭素化合物であればよく、例えばグルコース、シユクロース、マルトース、スターチ、デキストリン、モラッセなどが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、

- 12 -

例えばコーン・スターチ・リカー、大豆粉、綿実粉、小麦グルテン、ペプチン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、アンモニウム塩、硝酸塩などが使用される。その他、リン酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、ナトリウム、コバルト、鉄、マンガンなどの塩類が必要に応じて使用される。

培養温度は菌が発育し、ゲンタミシン C1a を生産する範囲内で適宜変更し得るが、特に好ましくは 25 ~ 35 °C である。培養時間は、条件によつて多少異なるが、通常 100 ~ 200 時間程度であつて、ゲンタミシン C1a が最高力価に達する時期を見計つて適当な時期に培養を終了すればよい。

このようにして得られたゲンタミシン C1a 生産菌の液体培養の培養物中において、ゲンタミシン C1a は液体部分に大部分生産されている。

次いでこのゲンタミシン C1a 生産菌の培養物からゲンタミシン C1a を採取するのであるが、ゲンタミシン C1a は水溶性の塩基性アミノ糖化合物であることを利用して分離精製を行なうことが簡便

- 13 -

である。また生産されたゲンタミシン C1a はバチルス・ズブテリス PC1219 を被検菌として、通常の寒天板法により活性区分の確認、および定量を行つたものである。

ゲンタミシン C1a の分離精製手段の一例を示すと次の通りである。すなわちゲンタミシン C1a 生産菌を前述の如く培養して得られる培養物から固形分を除去して培養液を得るのであるが、ゲンタミシン C1a がアミノ糖化合物であるためにその培養物の pH を一旦酸性に調整し、これを中和して調製してその培養液を得ることが好ましく、次いでこの培養液を陽イオン交換樹脂例えばアンバーライト I R C-50 (NH₄⁺ 型) のカラムにチャージせしめて吸着せしめ、これにより活性物質を 2 N アンモニア水にて溶出せしめ、さらにその溶出液を蒸餾した後、その pH を調整し、陽イオン交換樹脂例えば CM-セフアデックス C-25 (NH₄⁺ 型) のカラムにチャージせしめて吸着せしめ、0 ~ 0.35 N の濃度勾配をもたせたアンモニア水にて溶出せしめ、その活性成分を

- 14 -

得、これを減圧濃縮し、凍結乾燥することによりゲンタミシン C1a の精製白色粉末を遊離塩基の型にて得られる。またこのようにして得られるゲンタミシン C1a は薄層クロマトグラフィーにて単一スポットを示すものであることが簡便に示し得る。

次いでこのようにして得られた本発明のゲンタミシン C1a の物理化学的性状を挙げれば次の通りである。

分子量

449 (マスマスペクトルより)

分子式

C₁₀ H₂₉ N₆ O₇

比旋光度

[α]_D²⁵ = +96.2 (C = 0.39, H₂O)

ペーパークロマトグラフィー

クロロホルム：メタノール：17%アンモニア水 (2:1:1) R_f = 0.22プロパノール：ピリジン：酢酸：水 = (6:4:1:3) 上層液 R_f = 0.29

色性状

- 15 -

白色粉末

上記の性状、さらにマスマスペクトルの各ピーク、核磁気共鳴スペクトルなどより、本発明により得られる化合物が、前記の文献記載のゲンタミシンC1aと同一物質であると同定された。

次に本発明の実施例を挙げて具体的に説明するが、本発明はこれにより何んら限定されるものではない。

実施例1

デキストリン1%、グルコース1%、カゼイン水解物0.5%、酵母エキス0.5%、炭酸カルシウム0.1%を含有する培地(PH7.0)100mlを500ml容三角フラスコに分取し、120℃、20分間加熱殺菌した。本培地10本に、各々クテロスポランジウム・タイランデンセ6367株の斜面培養液よりの一白金耳を接種し、30℃、120時間振盪培養した。次いでこれを上記と同一組成の加熱殺菌した培地20ℓを含有する30ℓ容ジャーフアーマンターに移移し、30℃、72時間、300rpm、毎分20ℓの無菌空気の

- 16 -

特開昭55-156592(6)

条件下で通気攪拌培養した。次いでデキストリン5%、グルコース0.5%、脱脂大豆粉3%、炭酸カルシウム0.7%、塩化コバルト1.3ppmを含有する加熱殺菌した培地(PH7.2)200ℓを含有する250ℓ容タンクに上記の培養物10ℓを移植し、30℃、120時間、250rpm、毎分100ℓの無菌空気の条件下で通気攪拌培養し、培養物約190ℓを得た。

次いで、実施例2'の如くして、その培養物よりゲンタミシンC1aを分離精製するものである。

実施例2

実施例1で得られた培養物を、12N硫酸水溶液にてPH2に調整し、30分間攪拌した後、濃アンモニア水にてPH7.0に調整し、さらにこれに阻滯剤としてパーライト(商品名)4gを加えて阻滯し、次いで得られた培養液を、アンバーライトIRC-50(ローム・アンド・ハース社製)(NH₄⁺型)10ℓを充填したカラムにチャージし、水洗した後、2Nアンモニア水20ℓにて溶出せしめ、その全溶出液を得て、これを

- 17 -

100mlまで減圧濃縮した。

次いでこの濃縮液を6N硫酸水溶液にてPH7.0に調整し、これを、CM-セファテックスG-25(フアルマシア・フアイン・ケミカル社製)(NH₄⁺型)500mlを充填したカラム(径4cm)にチャージして活性物質を吸着せしめた。その後該カラムを水洗後、0~0.35Nの濃度勾配をもたせたアンモニア水5ℓにより溶出せしめ、溶出液を20mlずつ分画した。各分画について、クロロホルム：メタノール：28%アンモニア水=1：1：1の下層を展開溶媒とした薄層クロマトグラフィーを行ない、ニンヒドリン発色により目的物を確認した。その結果、第235面分より245面分がゲンタミシンC1aのみを含有したものであった。次いでこの面分を回収、合せて減圧濃縮し、次いで凍結乾燥してゲンタミシンC1a85%を得た。

特許出願人 東洋醸造株式会社

代表者 伊東富士馬

- 18 -

手続補正書

昭和55年 補 / H

特許庁長官 川原能雄 殿

1. 事件の表示

昭和54年特許願第60021号

2. 発明の名称

抗生物質ゲンタミシンC1aの製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 静岡県田方郡大仁町三浦632の1

名称 東洋醸造株式会社

代表者 伊東富士馬

4. 補正命令の日付

日付

5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

6. 補正の内容

明細書第4頁第16行の

「diaminopimelic」を

「diaminopimelic」と訂正する



同第18頁第3行の
「セフアデックスG」を
「セフアデックスO」と訂正する